

Rec'd PCT/PTO 07 SEP 2004
PCT/JP03/02657

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

10/506807

06.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月 7日

REC'D 05 MAY 2003

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-062050

[ST.10/C]:

[JP2002-062050]

出 願 人

Applicant(s):

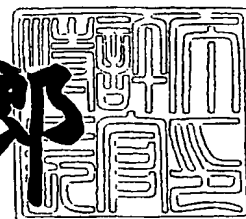
株式会社 エンパイオテック・ラボラトリーズ

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月15日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3026459

【書類名】 特許願

【整理番号】 PEBL6

【提出日】 平成14年 3月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江東区青海2丁目45番地 株式会社エンバイオ
テック・ラボラトリーズ内

 【氏名】 水上 春樹

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江東区青海2丁目45番地 株式会社エンバイオ
テック・ラボラトリーズ内

 【氏名】 西 和人

【特許出願人】

 【識別番号】 399051401

 【氏名又は名称】 株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ

【代理人】

 【識別番号】 100103160

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 志村 光春

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 061920

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9909455

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 低分子物質検出器具

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ①被験試料を接触させるための、被験試料適用部位、②被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識体を非結合状態で含む、標識体反応部位、③標的物質に結合していないフリーの標識体を捕捉することが可能な要素を結合状態で含む、未反応標識体捕捉部位、および、④標識体が結合した標的物質と接触すると視覚的な変化を生じる検出要素を含む、検出部位、を含み、かつ、標的物質が、微量成分として生活環境に存在する低分子人工化学物質である、低分子物質検出器具。

【請求項2】 検出部位における検出要素が、金属コロイド粒子である、請求項1記載の低分子物質検出器具。

【請求項3】 検出部位における検出要素が、結合状態で含まれる、請求項1または2記載の低分子物質検出器具。

【請求項4】 未反応標識体捕捉部位における、標的物質に結合していないフリーの標識体を捕捉することが可能な要素が、標的物質、または、標的物質の類似物質である、請求項1～3のいずれかに記載の低分子物質検出器具。

【請求項5】 未反応標識体捕捉部位、および、検出部位が、多孔性のクロマトグラフィー用メンブレンに固定化された担体を基材とする、請求項1～4のいずれかに記載の低分子物質検出器具。

【請求項6】 標的物質が、ダイオキシン類、および／または、PCB類である、請求項1～5のいずれかに記載の低分子物質検出器具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定物質の検出器具に関する発明である。

【0002】

【従来技術】

近年、ダイオキシン類、PCB類、その他の環境汚染物質による、環境汚染が

深刻化し、人体および生体への影響が懸念されている。これまで、ダイオキシン類等の環境汚染物質の検出方法としては、ガス・クロマトグラフ質量分析法（GC-MS法）を中心とした分析法が用いられてきた。GC-MS法は、公定分析法として用いられており、その感度、精度共、非常に優れた方法であるが、特殊な装置を必要とするために、分析コストが高く、分析の手順自体も煩雑である等の問題点が認められる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

ダイオキシン類等の環境汚染物質を、一般的には、GC-MS法よりも簡便な、これらの化学物質に対する抗体を用いるELISA法により、検出を行うことは、上記の問題点の解決手段の一つとして認められている。

【0004】

すなわち、ELISA法は、定量性に優れ高感度であるが、通常、サンプルの検出に特殊な機器を必要とするか、必要としない場合でも、検出するまでの時間が1時間以上かかる等の欠点を有している。これらの欠点を補うため、操作が単純で、高感度であり、検出時間が短い最も簡便な手法として、免疫クロマトグラフィーが注目されている。

【0005】

免疫クロマトグラフィーにおいて最も広く利用されているELISA法の態様としては、被験物質である高分子物質（それ自身で抗原性を有する物質）の異なる部位に結合する2種類の抗体を利用したサンドイッチ法が挙げられる。このサンドイッチ法を利用した検出器具では、標的物質となっている高分子物質の濃度に比例した強度の着色を生じ、被験物質の検出が容易であることから、病院での臨床検査、家庭での妊娠検査等において、広く普及している。

【0006】

しかしながら、被験物質が、ダイオキシン類やPCB類のように、低分子化合物である場合は、低分子化合物と抗体との分子量の差が著しいため、サンドイッチ法を適用することは困難である。このため、低分子化合物を免疫クロマトグラフィーで検出する際には、標的となる低分子化合物と、低分子化合物もしくは低

分子化合物に対する類似化合物を、抗体に対する結合において競合させて、標的低分子化合物を検出する、競合法が用いられている。

【0007】

ただし、競合法を用いた場合は、低分子化合物の濃度に反比例した強度の着色を指標にせざるを得ないため、標的物質の濃度に比例した強度の着色を指標とするサンドイッチ法に比較し、被験物質の判定が煩雑となる。このため、競合法を用いた免疫クロマトグラフィーは、広く普及するに至っておらず、ダイオキシンやPCB等の低分子の環境汚染物質の検出に用いることは困難である。

【0008】

そこで、本発明は、このような低分子化合物検出用の従来型免疫クロマトグラフィーが有する問題点を考慮し、被験物質中の標的物質であるダイオキシン類等の環境汚染物質の濃度の上昇に応じて、検出部位における着色の強度が増加する、免疫クロマトグラフィーを用いた低分子物質の検出器具を提供し、簡便、かつ、鋭敏に、環境汚染物質の検出を行う途を与えることを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、これらの課題の解決に向けて鋭意検討を重ねた結果、以下の低分子物質検出器具を提供することにより、この課題を解決し得ることを見出した。

【0010】

すなわち、本発明は、①被験試料を接触させるための、被験試料適用部位、②被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識体を非結合状態で含む、標識体反応部位、③標的物質に結合していないフリーの標識体を捕捉することが可能な要素を結合状態で含む、未反応標識体捕捉部位、および、④標識体が結合した標的物質と接触すると視覚的な変化を生じる検出要素を含む、検出部位、を含み、かつ、標的物質が、微量成分として生活環境に存在する低分子人工化学物質である、低分子物質検出器具（以下、本検出器具ともいう）を提供する発明である。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を説明する。

第1図は、本検出器具の一実施態様を示した図面（上面図）であり、第2図は、第1図の本検出器具10を、実線I-I'に沿って横断して示した横断面図である。

【0012】

本検出器具10において、被験試料適用部位1、標識体反応部位2、メンブレン6、および、吸収部位5は、各々、細長形状の薄膜7の上面に全部または一部が、接着している。また、未反応標識体捕捉部位3と検出部位4は、メンブレン6上に、各々、設けられている。より詳細には、まず、薄膜7の一端に、被験試料適用部位1の一端側が接着されている。これに対して、被験試料適用部位1の他端側は、その一端が被験試料適用部位1の薄膜7との接着部分（被験試料適用部位1の一端側）と隣合って、薄膜7に接着されている標識体反応部位2の、一端側の上面に被さって、標識体反応部位2と接触している。また、標識体反応部位2の他端側は、その一端が標識体反応部位2の薄膜7との接着部分（標識体反応部位2の一端側）と隣合って、その全面が薄膜7に接着されているメンブレン6の一端側の上面に被さって、メンブレン6と接触している。薄膜7の他端には、吸収部位5の一端側が接着されている。これに対して、吸収部位5の他端側は、メンブレン6の他端側の上面に被さって、メンブレン6と接触している。

【0013】

未反応標識体捕捉部位3と検出部位4は、両者共、これらの部位を構成する化学成分を、メンブレン6に固定することにより、メンブレン6において設けられている。

【0014】

本検出器具10において、被験試料は、これを接触させる被験試料適用部位1から吸収部位5に向けて、毛細管現象により移動して、被験試料中の低分子物質の検出が行われる（以下、本検出器具の被験試料適用部位側を「上流」、同吸収部位側を「下流」ともいう）。第1図および第2図において、上流から下流への被験試料の移動方向は、矢印7により示される。

【0015】

本検出器具 10 における被験試料中の標的物質は、微量成分として生活環境に存在する低分子人工化学物質（以下、これらの物質を、「環境汚染物質」と総称することもある）である。環境汚染物質としては、特に、いわゆる「環境ホルモン」として、内分泌攪乱作用が疑われる物質が、好適な対象として挙げられる。具体的には、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニール（PCB）類、ポリ臭化ビフェニール（PBB）類、ヘキサクロロベンゼン（HCB）、ペンタクロロフェノール（PCP）、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、アミトロール、アトラジン、アラクロール、CAT（シマジン）、ヘキサクロロシクロヘキサン、エチルパラチオン、NAC（カルバリル）、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、DDT（ジクロロジフェニルトリクロロエタン）、DDE（ジクロロジフェニルトリクロロエチレン）、DDD（ジクロロジフェニルジクロロエタン）、ケルセン、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、エンドスルファン（ベンゾエピン）、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシサイド、マラチオン、メソミル、メトキシクロル、マイレックス、ニトロフェン、トキサフェン、トリブチルスズ、トリフェニルスズ、トリフルラリン、アルキルフェノール（C5～C9）ノニルフェノール、オクチルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ベンゾ（a）ピレン、2,4-ジクロロフェノール、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、アルディガーブ、ベノミル、キーボン（クロルデコン）、マンゼブ（マンコゼブ）、マンネブ、メチラム、メトリブジン、シベルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ペルメトリン、ピンクロゾリン、ジネブ、ジラム、フタル酸ジベンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピル等が挙げられる。

【0016】

上に列挙した環境汚染物質の中でも、最も典型的には、ダイオキシン類やPCB類が挙げらる。ダイオキシン類としては、例えば、ダイオキシン類特別措置法で指定されている29種類のダイオキシン類を挙げることができる。すなわち、2,3,7,8-T₄ CDD、1,2,3,7,8-P₅ CDD、1,2,3,4,7,8-H₆ CDD、1,2,3,

6,7,8- H_6 CDD、1,2,3,7,8,9- H_6 CDD、1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDD、1,2,3,4,6,7,8,9- O_8 CDD等のジベンゾダイオキシン類；3,4,4',5- T_4 CB、3,3',4,4'- T_4 CB、3,3',4,4',5- P_5 CB、3,3',4,4',5,5'- H_6 CB、2,3,3',4,4'- P_5 CB、2,3,4,4',5- P_5 CB、2,3',4,4',5- P_5 CB、2',3,4,4',5- P_5 CB、2,3,3',4,4',5- H_6 CB、2,3,3',4,4',5'- H_6 CB、2,3',4,4',5,5'- H_6 CB、2,3,3',4,4',5,5'- H_7 CB等のコプラナーPCB類；2,3,7,8- T_4 CDF、1,2,3,7,8- P_5 CDF、2,3,4,7,8- P_5 CDF、1,2,3,4,7,8- H_6 CDF、1,2,3,6,7,8- H_6 CDF、1,2,3,7,8,9- H_6 CDF、2,3,4,6,7,8- H_6 CDF、1,2,3,4,6,7,8- H_7 CDF、1,2,3,4,7,8,9- H_7 CDF、1,2,3,4,6,7,8,9- O_8 CDF等のジベンゾフラン類等が挙げられる。

【0017】

PCB類としては、例えば、2-Monochlorobiphenyl、3-Monochlorobiphenyl、4-Monochlorobiphenyl；

【0018】

2,2'-Dichlorobiphenyl、2,3-Dichlorobiphenyl、2,3'-Dichlorobiphenyl、2,4-Dichlorobiphenyl、2,4'-Dichlorobiphenyl、2,5-Dichlorobiphenyl、2,6-Dichlorobiphenyl、3,3'-Dichlorobiphenyl、3,4-Dichlorobiphenyl、3,4'-Dichlorobiphenyl、3,5-Dichlorobiphenyl、4,4'-Dichlorobiphenyl；

2,2',3-Trichlorobiphenyl、2,2',4-Trichlorobiphenyl、2,2',5-Trichlorobiphenyl、2,2',6-Trichlorobiphenyl、2,3,3'-Trichlorobiphenyl、2,3,4-Trichlorobiphenyl、2,3,4'-Trichlorobiphenyl、2,3,5-Trichlorobiphenyl、2,3,6-Trichlorobiphenyl、2,3',4-Trichlorobiphenyl、2,3',5-Trichlorobiphenyl、2,3',6-Trichlorobiphenyl、2,4,4'-Trichlorobiphenyl、2,4,5-Trichlorobiphenyl、2,4,6-Trichlorobiphenyl、2,4',5-Trichlorobiphenyl、2,4',6-Trichlorobiphenyl、2',3,4-Trichlorobiphenyl、2',3,5-Trichlorobiphenyl、3,3',4-Trichlorobiphenyl、3,3',5-Trichlorobiphenyl、3,4,4'-Trichlorobiphenyl、3,4,5-Trichlorobiphenyl、3,4',5-Trichlorobiphenyl；

【0019】

2,2',3,3'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,4-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,4

'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,5-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,6-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,6'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,5-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,6-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,6'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',5,6'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',6,6'-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',4-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',4'-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',5-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',5'-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',6-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4,4'-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4,5-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4',5-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4',6-Tetrachlorobiphenyl、2,3,5,6-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4,5-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4,6-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4',5-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4',6-Tetrachlorobiphenyl、2,3',5,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,3',5',6-Tetrachlorobiphenyl、2,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl、2,4,4',6-Tetrachlorobiphenyl、2',3,4,5-Tetrachlorobiphenyl、3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl、3,3',4,5-Tetrachlorobiphenyl、3,3',4,5'-Tetrachlorobiphenyl、3,3',5,5'-Tetrachlorobiphenyl、3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl；

【 0 0 2 0 】

2,2',3,3',4-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,3',5-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,3',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,4'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,5-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,5'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,6'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4',5-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,5,5'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,5,6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,5,6'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,5',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,6,6'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3',4,5-Pentachlorobiphenyl、2,2',3',4,6-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,4',5-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,4',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,5,6'-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,5',

6-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,6,6'-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4,5-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4',5-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4,5'-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4,6-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4',6-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',5,5'-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',5,6-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',5',6-Pentachlorobiphenyl、2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl、2,3,4,4',6-Pentachlorobiphenyl、2,3,4,5,6-Pentachlorobiphenyl、2,3,4',5,6-Pentachlorobiphenyl、2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl、2,3',4,4',6-Pentachlorobiphenyl、2,3',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl、2,3',4,5',6-Pentachlorobiphenyl、2',3,3',4,5-Pentachlorobiphenyl、2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl、2',3,4,5,5'-Pentachlorobiphenyl、2',3,4,5,6'-Pentachlorobiphenyl、3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl、3,3',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl；

【 0 0 2 1 】

2,2',3,3',4,4'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',4,5-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,4,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,5,6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,5,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,5,5',6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,5,6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',4,4',5,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,4',6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,5,6-Hexachlorobiphenyl

1、2,3,3',4,5',6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4',5,6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4',5',6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',5,5',6-Hexachlorobiphenyl、2,3,4,4',5,6-Hexachlorobiphenyl、2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,3',4,4',5',6-Hexachlorobiphenyl、3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl；

【 0 0 2 2 】

2,2',3,3',4,4',5-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,5'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,6,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4',5,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,5,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',6,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,5,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,5,6,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,6,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4,4',5,6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4,4',5,6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4,5,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4',5,5',6-Heptachlorobiphenyl；

【 0 0 2 3 】

2,2',3,3',4,4',5,5'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',5,6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',5',6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',6,6'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,5',6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,6,6'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5',6,6'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4',5,5',6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,5',6,6'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,5',6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,6,6'-Octachlorobiphenyl、2,3,3',4,4',5,5',6-Octachlorobiphenyl；

【 0 0 2 4 】

2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',5,6,6'-Nonachlorobiphenyl；

lorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,5',6,6'-Nonachlorobiphenyl ; Decachlorobiphenyl等が挙げられる。

【0025】

なお、上述したような、本検出器具において用いるべき、ダイオキシン類やPCB類に対する抗体を調製する場合の指針は、被験試料におけるダイオキシン類やPCB類の毒性を推定する場合と、これらの環境汚染物質の総量を推定する場合とでは、ターゲットとして好適な異性体が異なる。例えば、被験試料のダイオキシン類による毒性を推定する場合は、被験物質中のダイオキシン類の全毒性に占める割合が高い、1,2,3,7,8-P₅ C C D、2,3,4,7,8-P₅ C D F、または、3,3',4,4',5-P₅ C B D D等をターゲットとするのが好適である。また、被験試料におけるダイオキシン類の総量を推定する場合には、ダイオキシン類として被験試料中に含まれる濃度が高い傾向が強い、1,2,3,4,6,7,8,9-O₈ C D D、1,2,3,4,6,7,8,9-O₈ C D F、または、2,3',4,4',5-P₅ C B等をターゲットとすることが好適である。

【0026】

被験試料は、ダイオキシン類やPCB類等の、環境関連低分子物質であれば限定されず、例えば、大気、土壌、湖水や海水等の水試料等が挙げられる。被験試料は、その性質に応じて、様々の前処理、例えば、希釈処理、濾過処理、濃縮処理等を行って、これを被験試料として、本検出器具10を適用することもできる。

【0027】

被験試料適用部位1の材質は、この被験試料適用部位1に接触させた被験試料が、毛細管現象によって下流の標識体反応部位2に移動可能な材質であれば特に限定されない。例えば、濾紙等の紙類、起毛素材等の布類、コットン、グラスファイバー等を挙げることができる。

【0028】

被験試料を、本検出器具10の被験試料適用部位1に接触させて、標識体反応部位2と接触している部分に到達すると、さらに、毛細管現象により、被験試料は、標識体反応部位2に移行する。

【0029】

標識体反応部位2は、被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識体を非結合状態で含む部位である。

この標識体反応部位2において用いる抗体は、検出の対象とする環境汚染物質を選んで、これを免疫抗原（必要に応じて、目的とする環境汚染物質をターゲットとしたハプテンとキャリア蛋白との免疫抗原とすることも可能である）として、常法により製造して用いることができる。

【0030】

すなわち、上記抗体がポリクローナル抗体の場合には、目的とするダイオキシン類やPCB類等を免疫抗原として免疫した動物に由来する免疫血清から製造することが可能であり、同じくモノクローナル抗体の場合には、ポリクローナル抗体と同様の方法で、免疫した動物の免疫細胞と動物の骨髄腫細胞とのハイブリドーマを作出し、これにより目的とするダイオキシン類やPCB類等を認識する抗体を産生するクローンを選択し、このクローンを培養することにより製造することができる。

【0031】

免疫される動物も特に限定されるものではなく、マウス、ラット等を広く用いることができるが、モノクローナル抗体を製造する場合には、細胞融合に用いる骨髄腫細胞との適合性を考慮して選択することが望ましい。

【0032】

免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を免疫の対象とする動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等で投与することにより行うことができる。

より具体的には、上記免疫抗原を所望により通常のアジュバントと併用して、免疫の対象とする動物に2～4週間毎に上記手段により数回投与し、ポリクローナル抗体製造のための免疫血清又はモノクローナル抗体製造のための免疫細胞、例えば免疫後の脾臓細胞を得ることができる。

【0033】

モノクローナル抗体を製造する場合、この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髄腫細胞としては、既に公知のもの、例えばSP2/O-Ag14

, P3-NS1-1-Ag4-1, MPC11-45, 6. TG1. 7 (以上、マウス由来); 210. RCY. Ag1. 2. 3 (ラット由来); SKO-007, GM15006TG-A12 (以上、ヒト由来) 等を用いることができる。

【0034】

上記免疫細胞とこの骨髓腫細胞との細胞融合は、通常公知の方法、例えばケーラーとミルシュタインの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256, 495 (1975)) 等に準じて行うことができる。

【0035】

より具体的には、この細胞融合は、通常公知の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (PEG), センダイウイルス (HVJ) 等の存在下において、融合効率を向上させるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。

【0036】

所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT (ヒポキサンチン, アミノプテリン及びチミジン) 培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行うことができる。このようにして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とするモノクローナル抗体の検索及び単一クローン化に供することができる。

【0037】

目的とするモノクローナル抗体産生株の検索は、例えばELISA法、プラーク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー法、RIA法等の一般的な検索法に従い行うことができる。

【0038】

このようにして得られる環境汚染物質を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、さらに液体窒素中で長時間保存することもできる。

【0039】

このハイブリドーマからの目的とするモノクローナル抗体の採取は、ハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマを、このハイブリドーマに対して適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いることができる。

【0040】

このようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の手段により精製することができる。

【0041】

標識体反応部位2において用いる標識体は、通常、上記のような環境汚染物質に対する抗体を標識した標識抗体であることが好適である。

かかる標識としては、例えば、金コロイド粒子等の金属コロイド粒子、ラテックス粒子、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の発色機能を有する酵素等を用いることができる。すなわち、これらの標識と抗体を、常法により結合させて、標識体反応部位2において用いることができる。

【0042】

標識体反応部位2では、被験試料が、被験試料適用部位1から移動したきて、その中の標的物質の存在如何にかかわらず、被験試料と共に、毛細管現象によって、さらに下流の未反応標識体捕捉部位3に向けて移動可能となるように、上記の標識体は、標識体反応部位2の素材とは、非結合状態で存在していることが必要である。よって、上記の標識体は、標識体反応部位の素材に単純に染み込ませて定着させる等に止めることが好適である。また、標識体反応部位2の素材としては、このような単純な定着と溶離を実現しやすい素材が好適である。具体的には、濾紙等の紙類、起毛素材等の布類、コットン、グラスファイバー等を挙げるることができる。

【0043】

被験試料中に、標的物質が存在する場合には、標識体と標的物質が結合した標識複合体と、フリーの標識体が、下流に向けて移動し、標的物質が存在しない場合には、フリーの標識体のみが、下流に向けて移動する。

【 0 0 4 4 】

本検出器具 1 0 においては、メンブレン（毛細管現象により、液相の移動が可能な素材、例えば、多孔性のクロマトメンブレン、ニトロセルロースメンブレン等が好適である。特に、多孔性のクロマトメンブレンは、多孔性故、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の蛋白質や、金コロイド粒子等の金属コロイド粒子、ラテックス粒子等の標識がメンブレン中を容易に移動可能であり、好適である。）上に、未反応標識体捕捉部位 3 と検出部位 4 が、上流から下流に向けて設けられている。

【 0 0 4 5 】

毛細管現象により、上流から移動してきた、標識複合体および／またはフリーの標識体は、まず、未反応標識体捕捉部位 3 に接触する。未反応標識体捕捉部位には、文字通り、未反応のフリーの標識体のみを捕捉することができる機能が付与されている。かかる機能の態様としては、標識体の一部を構成する標的物質に対する抗体が反応して結合することが可能な物質、具体的には、標的物質そのもの、または、このような結合反応が認められる標的物質の類似物質を挙げることができる。未反応標識体捕捉部位 3 では、これらの標的物質等が、液相の移動に伴って、移動することのないよう、結合状態であることが必要である。標的物質は、低分子物質であるため、所望の結合状態とするためには、例えば、B S A 等のキャリア蛋白に、標的物質等を結合させ、この蛋白結合させた標的物質等を、蛋白固定の常法により、未反応標識体捕捉部位 3 に、結合状態で定着させることが好適である。

【 0 0 4 6 】

このように、未反応標識体捕捉部位 3 には、未反応のフリーの標識体のみを捕捉することができる機能が備わっており、被験試料中に標的物質が存在する場合には、上流より移動してきた標識複合体およびフリーの標識体のうち、フリーの標識体のみが捕捉され、標識複合体のみが、下流に移動する。また、被験試料中に標的物質が存在しない場合には、移動してくるのは、フリーの標識体のみであるので、標識体は、全て、未反応標識体捕捉部位 3 において捕捉され、下流に移動するのは、標識体を含まない液相のみとなる。

【0047】

次いで、未反応標識体捕捉部位3を通過した液相は、その下流に設けられている、検出部位4に接触する。検出部位4では、標識体において用いた標識を顕在化させる、標識顕在化機能が備わっている。かかる標識顕在化機能は、用いた標識に対応する顕在化機能である。顕在化機能としては、例えば、標識複合体が、当初から目視可能な標識（例えば、金コロイド粒子等）である場合には、標識複合体を凝縮した形態で捕捉可能な検出要素、例えば、用いた環境汚染物質に特異的な抗体に対して特異的な抗体、すなわち、抗イムノグロブリンを用いることが好適である。この抗イムノグロブリン抗体は、用いた環境汚染物質に特異的な抗体のパラトープ（抗原結合部位）以外の箇所に対して結合する抗体（例えば、抗Fc抗体等）を用いることが好適である。

【0048】

このような、抗イムノグロブリン抗体を、検出要素として、稠密的に検出部位4において固定化することにより、液相と共に移動してきた標識を濃縮・顕在化することが可能となる。

【0049】

また、例えば、用いた標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の発色機能を有する酵素のように、検出部位4において、酵素基質の接触による発色等を行うことが必要な場合には、検出部位4における検出要素は、単に、抗イムノグロブリン抗体ではなく、用いた標識を顕在化させる試薬等が結合した態様であることが好適である。このような場合に、検出要素として、単に、発色機能を有する上記酵素等を用いる場合は、後で、改めて発色反応等を行わなければならない、取扱いが煩雑になってしまう。

【0050】

なお、いずれの例においても、抗イムノグロブリン抗体等の検出要素は、毛細管現象により、液相と共に検出部位4から移動しない、結合状態で含まれることが、標識を顕在化させる上で好適である。この結合状態の態様は、結果として、検出要素が、液相の移動と共に、検出部位4から移動しない状態が提供されれば特に限定されず、例えば、検出要素として、検出対象となる環境汚染物質に特異

的な抗体のパラトープ以外の箇所に対して結合する抗体である場合は、その抗体の溶液を、検出部位4に該当する部分に滴下することにより、所望する結合状態が提供される。

【0051】

また、吸収部位5は、毛細管現象により、上流から下流に移動してきた液相を、最終的に吸収する部位である。この吸収部位5は、本検出器具においては、選択的要素であるが、被験試料を、さらに容易にメンブレンを移動させるために、設けることが好適である。

【0052】

以上、記載したように、本検出器具10においては、被験試料中に標的物質が含まれている場合には、標的物質は、標識体反応部位2で、低分子化合物である標的物質と特異的に反応する標識体と、標識複合体を形成する。かかる標識複合体は、さらにメンブレン6上を移動するが、未反応標識体捕捉部位3では捕捉されず、検出部位4に達する。検出部位4では、標識複合体を顕在化する物質が固定化されているため、標識複合体は、検出部位4で濃縮され、目視可能なバンドとして検出される。

【0053】

一方、被験試料中に、標的物質が含まれていない場合は、標識体反応部位2で、上記の標識複合体は形成されず、フリーの標識体が、液相と共に移動する。このフリーの標識体は、全て、未反応標識体捕捉部位3で捕捉され、検出部位4には、標識体は到達せず、その結果、標識体のバンドは検出部位4においては検出されない。

【0054】

このように、本発明によって、従来は困難だった、環境汚染物質を、ポジティブな指標により検出する手段が提供される。

【0055】

【実施例】

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

1. C_o-PCB # 126モノクローナル抗体作製のための免疫抗原の調製

C o - P C B # 1 2 6 をターゲットとしたハプテン、6-[3,3,4,5-Tetrachlorobiphenyl-4-yl]oxy] hexanoic acid (低分子化合物126)は、既に報告されている、Ya-Wen Chiu ら (Analytical Chemistry, 1995, 67, 3829) における6-[(3,3,4-Trichlorobiphenyl-4-yl)oxy] hexanoic acid の合成法に若干の改善を加え、合成を行った。

【0056】

すなわち、2-chloroanisole と3,4,5-trichloroanilineとのcadogan カップリング反応により、3,3',4',5'-tetrachloro-4-methoxybiphenylを合成し(収率12%)、三臭化ホウ素による脱メチル反応により、3,3',4',5'-tetrachloro-4-hydroxybiphenylを得(収率90%)、これに、ethyl-6-bromohexanoateを反応させ、6-[(3,3',4',5'-tetrachloro-4-yl)oxy]hexanoate を得(収率90%)、これをアルカリ加水分解することで、6-[(3,3',4',5'-tetrachloro-4-yl)oxy]hexanoic acid (収率95%)を合成した。

【0057】

得られたハプテンは、N-hydroxysuccinimideを用いたNHS エステル法(P.Schneider and B.D.Hammonck, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 2, 85)により、カプトガニヘモシアニン(K L H)と結合させ、C o - P C B # 1 2 6 モノクローナル抗体作製のための抗原として利用した。

【0058】

すなわち、得られたハプテンを、1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl] carbodiimide とN-hydroxysuccinimideを用いて、活性エステルとした後、K L Hのアミノ基とのアミド結合を形成させ、ハプテン-K L H-コンジュゲートを得た。

【0059】

2. C o - P C B # 1 2 6 モノクローナル抗体作製

上記方法により作製、精製したC o - P C B # 1 2 6 低分子化合物-K L Hコンジュゲートを、b a l b / c マウスにRibi Adjuvant System (C o r i x a 社製)とともに、2週間おきに最大8回の免疫を行い、尾静脈に追加免疫を行った後、通常法により、脾臓中の抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行った。得られたハイブリドーマは、培養上清をC o - P C B # 1 2 6 低分子化合物

蛋白コンジュゲートを固相化したプレートを用いてスクリーニングを行い、C o - P C B # 1 2 6 に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。

【0060】

本実験に使用する抗体は、得られたハイブリドーマをプリスタン処理したマウス腹腔に投与し、通常法により腹水を採取後、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製したものを利用した。

【0061】

3. クロマトメンブレンの未反応標識体反応部位に固相化するための低分子化合物-蛋白質コンジュゲート調製

上記方法1において合成した低分子化合物126を、上記方法1と同様の手法でウシ血清アルブミン(BSA)と結合させ、透析により精製を行った後、クロマトメンブレンの未反応標識体捕捉部位に固定化するための低分子化合物-蛋白質コンジュゲートとして利用した。

【0062】

4. クロマトメンブレンの調整

ハイフロープラスメンブレン: HF90 (25mm×30cm、ミリポア社) の下端から5mmの位置に未反応標識体捕捉部位として、上記方法3にて合成した低分子化合物126・BSAコンジュゲートを塗布し、また、下端から15mmの位置に検出部位として、抗マウスIgGウサギ抗体(Zymed)を塗布した。これら溶液は、XYZハンドリングシステム(BioDot社)を用いてライン状に塗布した。塗布後、メンブレンは室温で1晩放置により乾燥させ、クロマトメンブレンとして用いた。

【0063】

5. 金コロイド粒子標識抗C o - P C Bモノクローナル抗体の作製

金コロイド粒子(平均粒子径約40nm、BBInternational)への抗C o - P C Bモノクローナル抗体の結合は、BBInternationalのプロトコールに従い行った。得られた金コロイド標識抗C o - P C Bモノクローナル抗体溶液は、OD520の値が5~6になるよう調整し、使用まで

冷蔵保存を行った。

【0064】

6. 金コロイドパッド（標識体反応部位）の作製

グラスファイバー製のコンジュゲートパッド（10mm×30cm、ミリポア社製）に、上記方法により得られた金コロイド標識抗体液（最終濃度：16%）に浸し、真空乾燥機で十分乾燥させたものを金コロイドパッドとして使用した。

【0065】

7. サンプルパッド（被験試料質適用部位）の調整

サンプルパッド（20mm X 30cm、ミリポア）を2%サッカロース、1%BSA、1%Triton X-100、PBS溶液に浸し、真空乾燥機で十分乾燥させたものをサンプルパッドとして使用した。

【0066】

8. 本検出器具の組み立て

上記方法により作製した、サンプルパッド、金コロイドパッドおよびクロマトメンブレンを、ラミネートカード（ミリポア）に、第1図および第2図に示したように装着した。さらに吸収パッド（17mm×30cm、ミリポア社製）を装着後、ギロチン型カッター（BioDot社）を用いて、ラミネートカードを、幅5mmに切断し、本検出器具として用いた。

【0067】

9. Co-PCB #126の測定

Co-PCB #126を、25%DMSO、TBS溶液で10ppm、5ppm、2.5ppm、1.25ppm、1ppm、0.1ppmに希釈した。これらの希釈Co-PCB #126、150μLをサンプルとして、8で組み立てた、本検出器具の、被験試料適用部位に滴下し、一定時間後（第1表参照）に検出部位の着色度合いを目視により判定した。その結果を、第1表に示す。

【0068】

【表1】

第 1 表

Co-PCB126濃度

検出部位の着色度合い

(ppm)

3 分 後

5 分 後

1 0 分 後

2 0 分 後

1 0	—	—	+	++
5	—	+	++	++
2 . 5	+	+	++	++
1 . 2 5	+	+	++	++
1	—	—	+	+
0 . 1	—	—	—	—
0	—	—	—	—

〔判定基準〕 ++ : 強い着色 + : 弱い着色 — : 着色無し

【 0 0 6 9 】

1 0 . 結 果

サンプル滴下 1 0 分後、目視判定により、サンプル中の Co-PCB 濃度が 1 ppm 以上の場合、陽性と判断可能であることが分かった。

【 0 0 7 0 】

【発明の効果】

本発明により、被験物質中の標的物質である環境汚染物質の濃度の上昇に応じて、検出部位における着色の強度が増加する、免疫クロマトグラフィーを用いた低分子物質の検出器具が提供され、簡便、かつ、鋭敏に、環境汚染物質の検出を行う途を与えられる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本検出器具の一実施態様を示した図面（上面図）である。

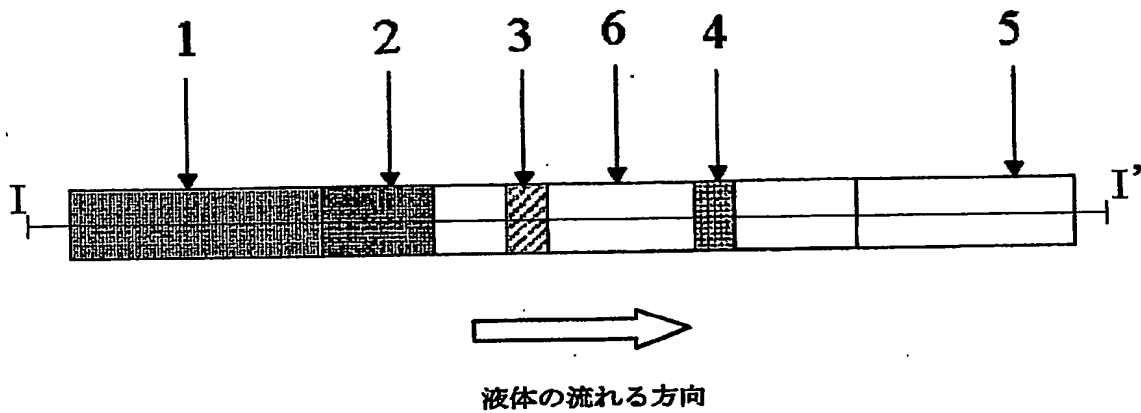
【図 2】 本検出器具の一実施態様を示した図面（横断面図）である。

【書類名】 図面

【図 1】

第 1 図

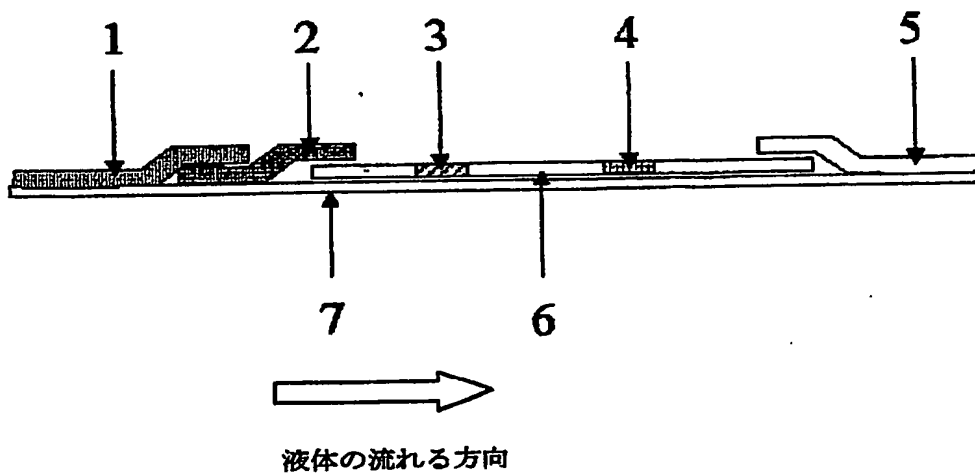
真上から見た図



【図 2】

第 2 図

側面から見た図



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 フィーが有する問題点を考慮し、被験物質中の標的物質であるダイオキシン類等の環境汚染物質の濃度の上昇に応じて、検出部位における着色の強度が増加する、免疫クロマトグラフィーを用いた低分子物質の検出器具を提供し、簡便、かつ、鋭敏に、環境汚染物質の検出を行う途を与えること。

【解決手段】 ①被験試料を接触させるための、被験試料適用部位、②被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識体を非結合状態で含む、標識体反応部位、③標的物質に結合していないフリーの標識体を捕捉することが可能な要素を結合状態で含む、未反応標識体捕捉部位、および、④標識体が結合した標的物質と接触すると視覚的な変化を生じる検出要素を含む、検出部位、を含み、かつ、標的物質が、微量成分として生活環境に存在する低分子人工化学物質である、低分子物質検出器具を提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[399051401]

1. 変更年月日 1999年 8月25日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都江東区青海2丁目45番地

氏 名 株式会社 エンバイオテック・ラボラトリーズ